



Instructions for Use

ANA Profile-8 ELISA

IVD



REF EIA-4325

Σ 96



DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße. 18, 35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de



DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.
Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.**

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis

1	OVERVIEW	2
2	WARNINGS AND PRECAUTIONS	2
3	PRINCIPLE OF THE TEST	3
4	CONTENTS OF THE KIT	3
5	MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	4
6	STORAGE OF THE KIT	4
7	REAGENT AND SAMPLE PREPARATION / SPECIMEN REQUIREMENTS	4
8	ASSAY PROCEDURE	5
9	EVALUATION AND QUALITY CONTROL	6
10	INTERPRETATION OF RESULTS / LIMITATIONS OF THE PROCEDURE	6
11	PERFORMANCE CHARACTERISTICS	7
12	DECLARATION	12
13	REFERENCES / LITERATURE	12
14	SUMMARY FLOW CHART	12
1	ÜBERSICHT	13
2	SICHERHEITSHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	13
3	TESTPRINZIP	14
4	INHALT DES TESTKITS	14
5	BENÖTIGTE, ABER NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN	16
6	AUFBEWAHRUNG DES TESTKITS	16
7	REAGENZIE- UND PROBENVORBEREITUNG / ANFORDERUNGEN AN DIE PROBEN	16
8	DURCHFÜHRUNG DES TESTS	17
9	AUSWERTUNG UND QUALITÄTSKONTROLLE	18
10	INTERPRETATION DER ERGEBNISSE / GRENZEN DER METHODE	18
11	TESTCHARAKTERISTIKA	19
12	GARANTIE UND HAFTUNG	23
13	LITERATUR	24
14	KURZANLEITUNG	24
	SYMBOLS USED	25

ELISA for the qualitative determination of autoantibodies (IgG) against dsDNA, RNP, Sm, SS-A/Ro, SS-B/La, Scl-70, CENP-B, and Jo-1

1 OVERVIEW

1.1 Introduction and background

Circulating autoantibodies against various intracellular antigens (antinuclear antibodies, ANA) are characteristic for systemic, autoimmune-mediated rheumatic diseases of the connective tissue (1, 2, 3, 4). These comprise Systemic Lupus Erythematosus (SLE), Mixed Connective Tissue Disease (MCTD), Sjögren's Syndrome (SS) A and B, Progressive Systemic Sclerosis (PSS, Scleroderma)/CREST Syndrome and Polymyositis (PM).

The diagnosis of the above disorders is often difficult, due to overlapping symptoms, and therefore usually supported by measuring their associated autoantibodies. 8 antigens specifically recognised by these antibodies are immobilised, line by line, on the solid phase of the present enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA):

solid phase line	antigen	source	disease	approximate autoantibody prevalence (5)
A	dsDNA	plasmid	SLE	60 - 90 %
B	RNP (proteins A, C, 68kDa)	recombinant	MCTD SLE PM SS	95 % 30 - 40 % 14 % 4 %
C	Sm (proteins B, B', D)	bovine thymus	SLE MCTD	12 - 39 % 7 %
D	SS-A/Ro (60kDa-protein)	bovine thymus	SS SLE MCTD PSS PM	60 - 100 % 45 - 50 % 15 - 30 % 5 - 7 % 5 - 7 %
E	SS-B/La	recombinant	SS SLE MCTD	30 - 90 % 15 - 30 % 5 - 15 %
F	Scl-70 (DNA-topoisomerase 1)	recombinant	PSS	20 - 76 %
G	CENP-B (centromere protein B)	recombinant	CREST	40 - 80 %
H	Jo-1 (Histidyl-tRNA-synthetase)	recombinant	PM	20 - 40 %

The test is designed for the individual, qualitative determination of IgG autoantibodies in human serum or plasma (cf. section 7), directed against one of the above antigens; as initial diagnosis if any of the associated disorders is suspected. The test is fast (incubation time 30 / 30 / 30 minutes) and flexible (divisible solid phase for 1 - 12 analyses, ready-to-use reagents). A negative and a positive control check the assay performance. The positive control also serves as calibrator for assay evaluation.

1.2 Intended Purpose

ANA Profile 8 IgG ELISA is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) intended for the individual qualitative determination of IgG class antibodies directed against double-stranded DNA, U1-RNP complexes (proteins A, C, 68kDa), Sm, SS-A/Ro 60, SS-B/La, Scl-70 (DNA-topoisomerase 1), CENP-B (centromereprotein B) and Jo-1 (Histidyl-tRNA synthetase) in human serum or plasma samples.

Its function is the aid to differential diagnosis of systemic, inflammatory autoimmune-mediated rheumatic diseases, like systemic lupus erythematosus, mixed connective tissue disease (MCTD, Sharp syndrome), Sjögren's Syndrome, Scleroderma (progressive systemic sclerosis, CREST Syndrome), polymyositis and dermatomyositis. This product is intended for manual or automated professional *in vitro* diagnostic use only.

2 WARNINGS AND PRECAUTIONS

The test kit is intended for *in vitro* diagnostic use only; not for internal or external use in humans or animals. It must be executed by trained professional staff.

The kit has been tested for transport stability and can be shipped unrefrigerated for up to 3 days. Store at 2 - 8°C on arrival. In case of doubt, contact your local distributor or the manufacturer.

Do not use reagents beyond their expiration dates. Adherence to the protocol is strongly recommended.

The sample buffer and controls contain Na-azide as antimicrobial agent. The wash buffer contains bromonitrodioxane and the conjugate methylisothiazolone / bromonitrodioxane as preservative. The substrate contains 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide (H₂O₂). The stop solution, 0.2 M sulfuric acid (H₂SO₄), is acidic and corrosive.

The above mentioned reagents may be toxic if ingested. Follow routine precautions for handling hazardous chemicals. Avoid all body contact, wear gloves and eye protection. If one of the reagents comes into contact with skin or mucous membrane, wash thoroughly with water. Never pipette by mouth. Dispose in a manner complying with local/national regulations.

Na-Azide may react with lead and copper plumbing to form explosive metal azides. On disposal, flush with a large amount of water to prevent azide build-up.

The controls contain components of human origin. They were tested for human immunodeficiency virus (HIV)-Ag, hepatitis B surface (HBs)-Ag and antibodies against HIV 1/2 and hepatitis C virus (HCV) and showed negative results; either in an FDA-approved or a CE-compliant test, according to European Directive 98/79/EC.

However, no test can guarantee that material of human origin is not actually infectious. The preparations should therefore be treated as potentially infectious and disposed of accordingly, as should the samples (and residues thereof); according to CDC (Center of Disease Control, Atlanta, USA) or other local / national guidelines on laboratory safety and decontamination.

3 PRINCIPLE OF THE TEST

The wells of the solid phase are coated with the autoantigens quoted above, line by line. On this surface, the following immunological reactions take place:

- 1st reaction: Antigen-specific antibodies present in the sample bind to the respective immobilised antigen, forming the antigen-antibody complex. Then, non-bound sample components are washed away from the solid phase.
- 2nd reaction: A second antibody, directed at human IgG antibodies and conjugated with horse-radish peroxidase (HRP), is added. This conjugate binds to the complex. Then, excess conjugate is washed away from the solid phase.
- 3rd reaction: The enzyme-labelled complex converts a colourless substrate into a blue product. The degree of colour development in each line of the solid phase reflects the concentration of the respective antigen-specific IgG autoantibody in the sample (8 values per sample).

4 CONTENTS OF THE KIT

a. ANA Profile-8 Coated Microwell Plate

1 microwell plate, coated line by line with 8 individual autoantigens, as described above. Hermetically packed in a foil laminate pouch together with a desiccant bag. The plate consists of 12 strips, thus providing maximum flexibility and economy in use of the assay.

MWP	12x8
-----	------

b. Sample Buffer

Sample buffer, 100 mL, ready-to-use, orange coloured.

Contains Tris-buffered saline (TBS), bovine serum albumin (BSA), Tween and Na-azide.

BUF	SPL
-----	-----

c. Wash buffer

Wash buffer, 100 mL, 10x-concentrate, blue coloured.

Contains TBS, Tween and bromonitrodioxane.

BUF	WASH	10x
-----	------	-----

d. ANA Profile-8 IgG Negative and Positive Control

Negative and positive control, 3.0 mL each, ready-to-use, green and red coloured, respectively.

Contain TBS, BSA, Tween and Na-azide.

CONTROL	-
---------	---

CONTROL	+
---------	---

e. ANA Profile-8 IgG 14 mL Conjugate

Anti-human IgG HRP conjugate, 14 mL, ready-to-use, red coloured.

Buffered solution containing stabilising protein, methylisothiazolone and bromonitrodioxane.

CONJ	IgG
------	-----

f. Substrate

Substrate solution, 14 mL, ready-to-use, colourless.

Contains a buffered solution of TMB and H₂O₂. Contained in a vial impermeable to light.

SUBS	TMB
------	-----

g. Stop solution

Stop solution (0.2 M H₂SO₄), 14 mL, colourless, ready-to-use.

Caution: sulfuric acid is corrosive.

SOLN	STOP
------	------

h. Instructions for Use**i. Lot-specific certificate of analysis****5 MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED**

- Deionised or distilled water
- Graduated cylinder, 1000 mL
- Tubes for sample dilution (transfer tubes in the microwell plate format recommended)
- Pipettes for 10, 100 and 1000 µL (1- and 8-channel pipettes recommended)
- Microwell plate washer (optional)
- Microwell plate photometer fitted with a 450 nm filter
- ELISA evaluation program (recommended)

6 STORAGE OF THE KIT

Store kit at 2 °C - 8 °C, do not freeze. It is stable up to the expiry date stated on the label of the box. Do not use kit beyond its expiry date.

7 REAGENT AND SAMPLE PREPARATION / SPECIMEN REQUIREMENTS

Do not exchange or pool corresponding components from different kits, due to possibly different shipping or storage conditions. If the kit is to be used for several tests, only the currently needed amount of reagents should be withdrawn. It is **crucially important** that no cross-contamination between the reagents occurs. Use only clean pipettes and do **not pour back** residues into the original flasks.

- The solid phase must reach room temperature before opening the pouch. Remove the supernumerary microwells from the frame and immediately put them back into the pouch, together with the desiccant bag. Reseal the pouch hermetically and keep it refrigerated for future use.
- Dilute the wash buffer 10x-concentrate (100 mL, blue) with 900 mL deionised water. Mix thoroughly. The diluted buffer is stable for several weeks if stored refrigerated (2 °C - 8 °C).

c. Preparation of the samples:

Handle patient specimens as if capable of transmitting infectious agents.

Besides serum, EDTA- or citrate-treated plasma are suitable sample material as well; heparin-treated plasma however is not.

Specimen requirements:

highly lipemic, haemolysed or microbially contaminated samples may cause erroneous results and should be avoided.

Prepare samples using normal laboratory techniques. Turbid samples must first be clarified (centrifuged).

The clarified or clear samples are mixed and then diluted **1/100**,

e.g. 10 µL serum or plasma + 990 µL sample buffer. Also mix the dilution.

For rapid dispensing during the assay procedure, preparation of the controls and samples in microwell transfer tubes is recommended. This allows the operation of an 8-channel pipette during the assay procedure.

If samples are not assayed immediately, they should be stored at 2 °C - 8 °C and assayed within 3 days.

Repeated freezing and thawing of samples should be avoided. Thawed samples must be mixed prior to diluting.

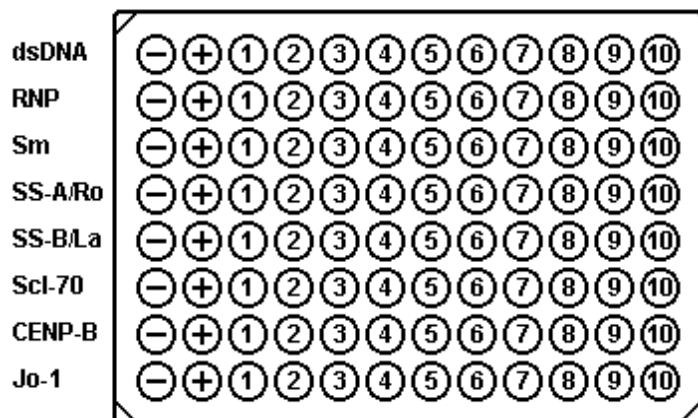
8 ASSAY PROCEDURE

8.1 Manual operation

Before starting the assay, all components of the kit must have reached room temperature (23 °C ±3°C).

To achieve best results, i.e. the maximum ratio between specific and background signal, **careful washing** is essential (steps a, c and e). It is **crucially important to remove the wash solution completely**. For that purpose, tap the plate firmly on several layers of absorbent tissue. Automated washers must be verified according to results obtained by manual washing.

- Immediately prior to use, wash the solid phase once: fill wells with 350 µL wash buffer each, let soak for about 10 seconds in the wells and remove.
- Dispense the controls (3,0 mL each, ready-to-use, green and red) and the diluted samples (1 - 10) rapidly into the microwells, as depicted below; 100 µL per well.



Incubate the plate for 30 minutes at room temperature (23 °C ±3 °C).

- Wash the wells 4 times as in step a.
- Rapidly (preferably using an 8-channel pipette) dispense the conjugate (14 mL, ready-to-use, red); 100 µL per well. Incubate the plate as in step b.
- Repeat wash step c.
- Rapidly (preferably using an 8-channel pipette) dispense the substrate solution (14 mL, ready-to-use, colourless, black vial); 100 µL per well. Incubate the plate as in step b. As the substrate is photosensitive, avoid intense light exposure (e.g. direct sunlight) during incubation.
- Rapidly (preferably using an 8-channel pipette) dispense the stop solution (14 mL, ready-to-use, colourless. Caution: corrosive!); 100 µL per well. Use the same sequence as for the substrate. The colour changes from blue to yellow. Agitate the plate, preferably on an orbital shaker, for about 10 seconds.
- Immediately read the absorbance in the microwell plate photometer at 450 nm.

Refrigerate the remainder of the reagents (2 °C - 8 °C) if they are to be used again.

8.2 Dynex DS2 automated ELISA system

This product has been validated for use with the Dynex DS2 automated ELISA system. A description of the program flow for the assay execution and evaluation can be provided as a pdf file. The parameters of this program are merely a proposal and may need to be adapted by the operator to the requirements of the actual assay. In general terms, we have attempted to stick as close as possible to the protocol of manual operation, as above. However, due to the necessarily elevated temperature within the DS2, the substrate incubation period had to be shortened.

Section 11.8 gives a performance comparison between manual assay operation and the DS2 ELISA system.

9 EVALUATION AND QUALITY CONTROL

The assay is evaluated in a qualitative manner: the absorbance of the samples is compared to the borderline absorbance (= cut-off), separately for each of the 8 parameters. The respective cut-off absorbance (8 individual values) is determined by means of the positive control which at the same time functions as calibrator; according to the formula:

$$\text{absorbance}_{\text{borderline}} = \text{absorbance}_{\text{positive control}} \times \text{factor}$$

The factor depends on the kit lot and is individually quoted for each parameter in the lot-specific certificate of analysis (included with each test kit). Example:

$$\begin{aligned} \text{absorbance}_{\text{positive control}} &= 1250 \text{ mOD} \\ \text{factor} &= 0.35 \\ \text{absorbance}_{\text{borderline}} &= 1250 \text{ mOD} \times 0,35 = 438 \text{ mOD} \end{aligned}$$

In order to gain an impression of the degree of a sample's reactivity towards the different antigens, the respective ratio values between sample and borderline absorbance is calculated, 8 times per sample:

$$\text{ratio} = \text{absorbance}_{\text{sample}} / \text{absorbance}_{\text{borderline}}$$

Example:

$$\begin{aligned} \text{absorbance}_{\text{borderline}} &= 438 \text{ mOD} \\ \text{absorbance}_{\text{sample}} &= 1480 \text{ mOD} \\ \text{ratio} &= 1480 \text{ mOD} / 438 \text{ mOD} = 3.4 \end{aligned}$$

Quality control:

The positive control (calibrator) and negative control check the assay performance. Their acceptable ranges are quoted in the lot-specific certificate of analysis. Values of the controls must fall within the indicated ranges; otherwise, the results of the assay are invalidated.

10 INTERPRETATION OF RESULTS / LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

In order to determine the cut off-concentration (i.e. ratio = 1,0) of each ANA in the present test, a normal and a respective collective of positive sera was measured; followed by ROC-analysis of these data according to (6), individually for each parameter (cf. article 11.7).

The cut off values established in this manner yield the test characteristics described below. Based on these measurements, we suggest for the assessment of patient sera:

	Ratio
normal (negative) range	< 0.80
cut-off	1.00
equivocal range	0.80 - 1.25
positive range	> 1.25

These specifications apply uniformly to all 8 parameters. However, they are given as an indication only; in order to check their accuracy, each analysis should include parallel samples of normal sera.

A negative test result indicates that the patient probably does not have an elevated level of IgG antibodies to the respective antigen. Hence, presence of the corresponding systemic autoimmune disorder, as outlined in the beginning, is unlikely but can nevertheless not be excluded.

A positive result should be considered as an indication for the associated disease. As follow-up diagnosis, the causative autoantibody should be determined by means of a monospecific, quantitative ELISA.

Specimens exhibiting results within the borderline range quoted above should be considered as equivocal and reported as such. It is recommended that a second sample be collected two weeks later and run in parallel with the first sample to document a possible change of antibody titer.

As with any serological test, the results should be interpreted in the light of the patient's symptoms and other diagnostic criteria.

11 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1 Standardisation

The test is standardised with a purified serum preparation containing IgG antibodies directed at each of the immobilised autoantigens. It constitutes the stock material for both controls of the test. The proportion of the antibodies was adjusted in such a manner that the controls generate an approximately uniform signal on all 8 solid phases (lines of the microwell plate).

This preparation is calibrated against a set of monospecifically positive sera, solely reserved for this purpose. The degree of sample reactivity is expressed as ratio, as outlined above, separately for all 8 antigens.

11.2 Analytical specificity

The test allows the specific and differentiated determination of human IgG antibodies, directed at one of the autoantigens quotes in article 1. It has been validated (among other criteria) using human reference sera from the Center of Disease Control (CDC; Atlanta, USA) which are commercially available. The following results (ratio values) are typical:

Serum	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CDC- result	ds- DNA	SS-B/La	--	U1- RNP	Sm	--	SS-A/Ro	--	Scl-70	Jo-1
Immun-Fluorescence	homogen	speckled	speckled	--	--	nucleolar	--	Centromere	--	--
dsDNA	3.5	0.2	0.2	0.2	0.4	0.1	0.4	0.2	0.4	0.1
RNP	0.8	0.2	5.0	3.9	5.3	1.0	0.3	0.2	0.3	0.2
Sm	1.8	0.2	1.6	0.2	5.4	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2
SS-A/Ro	0.4	2.9	4.2	0.4	1.0	0.2	5.7	0.2	0.7	0.2
SS-B/La	0.2	5.0	4.2	0.2	0.3	0.6	0.2	0.2	0.3	0.2
Scl-70	0.3	0.2	0.3	0.3	0.6	1.0	0.2	0.2	5.6	0.2
CENP-B	0.3	0.2	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2	4.4	0.3	0.2
Jo-1	0.3	0.2	0.3	0.3	0.3	0.2	0.3	0.2	0.3	7.7

Interference with anticoagulants (EDTA, Citrat, Heparin) in samples has been tested and no interference effects have been observed.

11.3 Detection limit (analytical sensitivity)

The detection limit is defined as that concentration of analyte that corresponds to the mean absorbance of sample buffer plus 3-fold standard deviation (s). It was determined as < 0.2 (ratio; n = 12); this applies for all eight parameters.

Recommended measuring range: 0.3 < ratio < 7

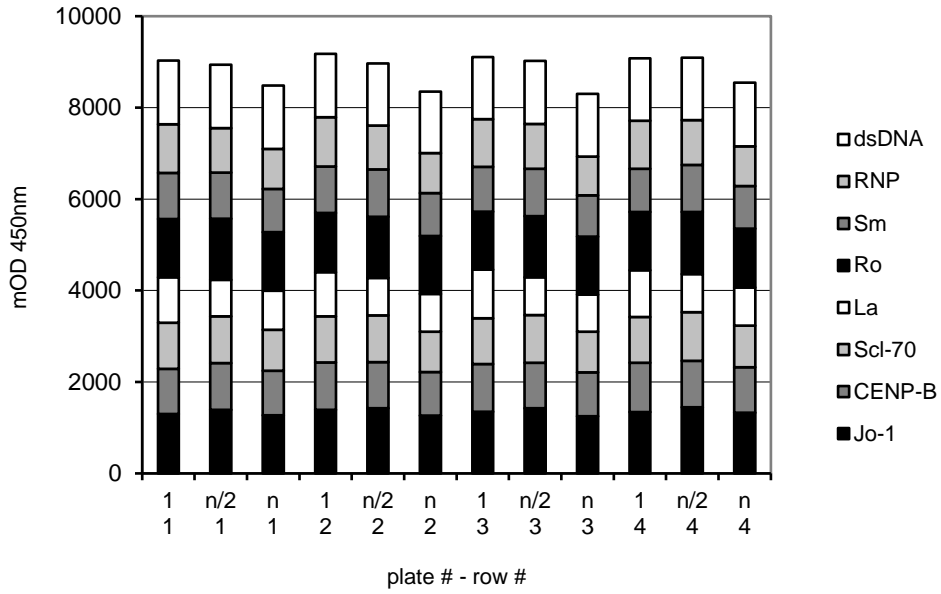
11.4 Homogeneity of the solid phase

Measurement of the solid phase homogeneity is a regular QC part of each production lot. This is determined by 3 (selected plates) x 8 (lines) x 12 (rows) = 288-fold measurement of an evenly positive but non-saturating sample (IgG).

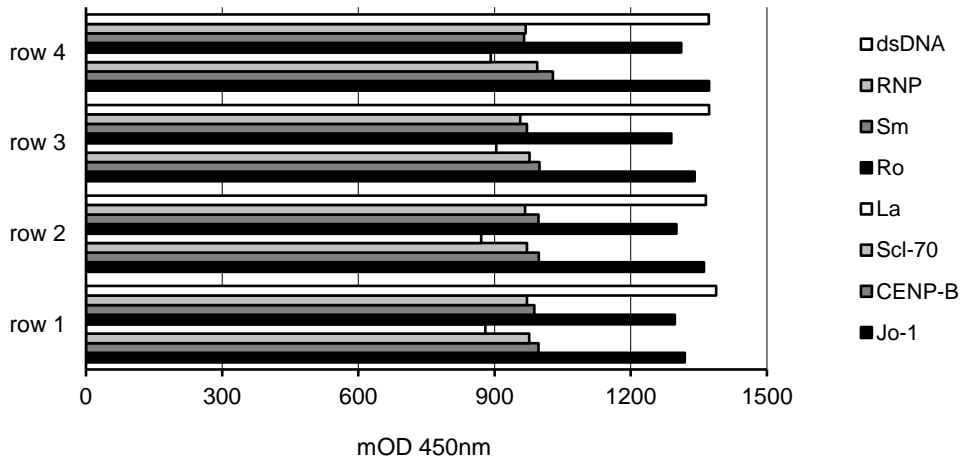
Acceptance criterion:

mOD-coefficient of variation (cv) over the plates, line by line < 10%. The figures below show a representative excerpt (1 third, to be exact) of such an analysis (solid phase lot no. 21020).

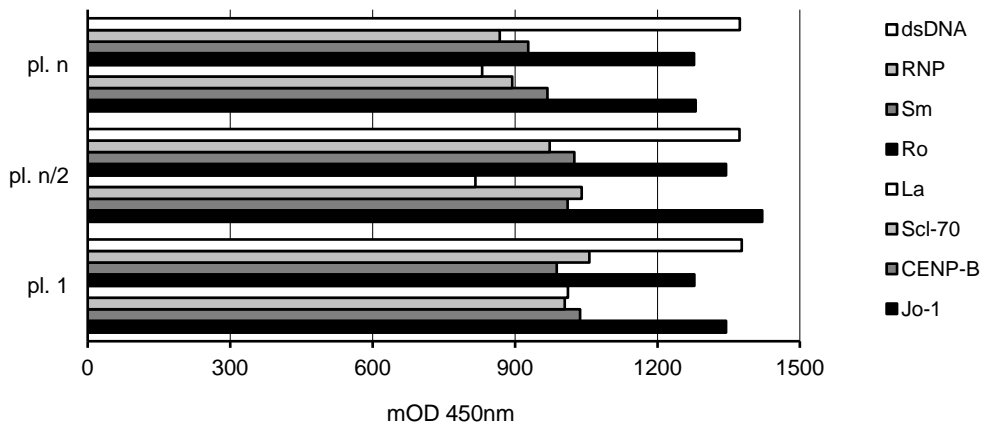
plate	1	n/2	n	1	n/2	n	1	n/2	n	1	n/2	n	mean	cv %
row	1	1	1	2	2	2	3	3	3	4	4	4		
line a	1396	1387	1382	1392	1357	1348	1359	1384	1374	1363	1364	1389	1375	1,2
line b	1063	973	878	1074	955	873	1041	980	848	1050	983	872	966	8,5
line c	1011	1006	946	1014	1036	940	982	1032	900	944	1025	926	980	4,8
line d	1272	1338	1282	1297	1340	1265	1263	1338	1268	1278	1362	1293	1300	2,7
line e	992	796	852	971	817	824	1068	826	817	1016	829	831	887	10,8
line f	1011	1024	895	1002	1027	886	1000	1044	887	1005	1067	909	980	6,7
line g	990	1024	976	1038	1007	948	1043	997	957	1077	1016	993	1006	3,7
line h	1297	1390	1271	1392	1425	1267	1348	1423	1252	1342	1445	1331	1349	5,0



Values of lines a - h in rows 1 - 4, averaged over plates 1, n/2 and n



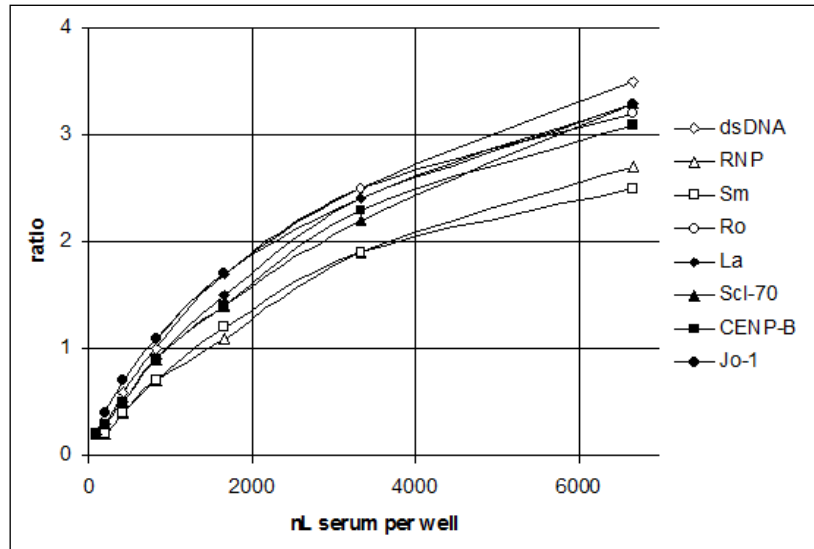
Values of lines a - h in plates 1, n/2 and n, averaged over rows 1 - 4



11.5 Dose-response relationship

In order to assess this feature of the ELISA, pools of individual sera with evenly adjusted reactivity towards all 8 antigens were measured in serial 2-fold dilution. A typical result is depicted below.

An approximately linear relationship between sample concentration and resulting ratio is restricted to ratio values < 2. This is due to the qualitative evaluation manner (cf. article 9) and contrasts ELISAs which are evaluated quantitatively by means of a standard curve.



11.6 Precision

For the assessment of the test precision, the variability of results under the following conditions was determined: a. within 1 assay and between 3 assays, b. between 3 operators and c. between 2 kit lots. Ratio and coefficient of variability (cv) values are given as mean of all 8 antigens.

a) Intra- and inter-assay variability (n = 3 and 9, respectively)

sample	ratio	variability (cv, %)	
		intra-assay	inter-assay
1	1.2	3.7	4.5
2	1.9	1.5	2.4
3	2.9	1.5	2.0

b) Operator to operator variability (n = 2)

sample	ratio	variability (cv, %)
1	1.1	2.4
2	1.8	1.8
3	2.7	1.8

c) Variability between 2 kit lots (n = 2)

sample	ratio	variability (cv, %)
1	1.1	5.3
2	1.8	3.3
3	2.8	6.0

11.7 Frequency distribution of the different ANAs (IgG)**a) In a normal collective**

This was analysed with a sera collective of blood donors, equally distributed by sex and age. The following distribution of the analytes was observed (ratio values quoted; s = standard deviation):

parameter	number of sera	mean	Mean + s	Mean + 2s	median	95 th percentile	diagnostic specificity
dsDNA	80	0.28	0.51	0.75	0.21	0.63	98 %
RNP	80	0.32	0.45	0.57	0.29	0.55	100 %
Sm	80	0.18	0.21	0.23	0.18	0.22	100 %
SS-A/Ro	80	0.25	0.30	0.35	0.25	0.33	100 %
SS-B/La	160	0.16	0.27	0.39	0.13	0.31	100 %
Scl-70	80	0.40	0.61	0.83	0.33	0.72	98 %
CENP-B	80	0.25	0.33	0.41	0.23	0.38	100 %
Jo-1	80	0.28	0.40	0.51	0.25	0.43	99 %

b) In positive collectives

In 8 collectives of positive sera, the following distribution of the respective autoantibodies was determined (ratio values quoted). The sera measured had been found positive before by independent methods (e.g. monospecific, CE-compliant reference ELISA, immune fluorescence) and/or in various ring trials or were clinically defined.

parameter	number of sera	mean	Mean + s	Mean + 2s	median	95 th percentile	diagnostic sensitivity
dsDNA	11	2.45	1.20	< 0	2.20	1.00	91 %
RNP	14	5.54	3.97	2.20	6.40	2.86	100 %
Sm	12	3.95	2.89	1.83	4.40	1.97	100 %
SS-A/Ro	17	4.92	4.02	3.12	5.30	3.60	100 %
SS-B/La	31	39.76	< 0	< 0	10.44	1.45	100 %
Scl-70	10	4.46	3.25	2.04	4.70	2.55	100 %
CENP-B	11	4.61	3.61	2.61	4.80	3.05	100 %
Jo-1	6	6.05	5.72	5.38	6.10	5.58	100 %

The quoted values for diagnostic specificity and sensitivity of the ELISA apply for the measured sera only. Other collectives may yield different results. In view of the low number of positive sera, particular caution is required when interpreting test sensitivity.

11.8 Manual operation vs. Dynex DS2 automated ELISA system

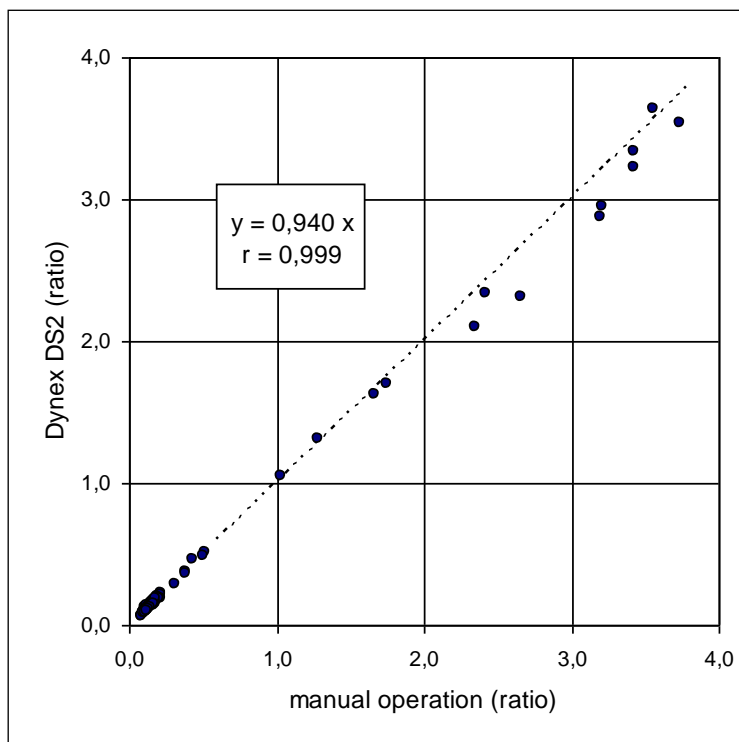
Variability:

Using specimen of one and the same kit lot, the variability of assay results were compared between manual operation and the Dynex DS2 automated ELISA system (cv values are given as mean of all 8 antigens):

	manual operation	Dynex DS2
intra-assay variability (n per parameter = 6)	mean cv = 1.4 %	mean cv = 1.3 %
inter-assay variability (n per parameter = 18)	mean cv = 1.6 %	mean cv = 2.0 %

Correlation:

In order to assess this feature of the ANA Profile 8 ELISA, 10 appropriately diluted CDC sera (cf. article 11.2) were measured on all 8 antigens with both methods. The results shown in the following figure:



12 DECLARATION

DRG guarantees that the product delivered has been thoroughly tested to ensure that its properties specified herein are fulfilled. No further warranties are given.

The performance data presented here were obtained using the procedure indicated. Any modification in the procedure may affect the results in which case DRG disclaims all warranties whether expressed, implied or statutory. Moreover, DRG accepts no liability for any damage, whether direct, indirect or consequential, which results from inappropriate use or storage of the product.

13 REFERENCES / LITERATURE

1. Nakamura, R. M., Tan, E. M.: Update on autoantibodies to intracellular antigens in systemic rheumatic diseases. *Clin Lab Med* 12 (1992), 1 - 23
2. Guma, M., Keil, L. B.: Autoantibodies to cellular antigens in systemic autoimmune diseases. *J Clin Immunoassay* 17 (1994), 98 - 107
3. Fritzler, M. J.: Clinical relevance of autoantibodies in systemic rheumatic diseases. *Mol Biol Rep* 23 (1996), 133 - 145
4. Hietarinta, M., Lassila, O.: Clinical significance of antinuclear antibodies in systemic rheumatic disease. *Ann Med* 28 (1996), 283 - 291
5. Messinger, M.: Autoantikörper bei systemischen entzündlich-rheumatischen Erkrankungen (Kollagenosen). In: L. Thomas (ed.): *Labor und Diagnose* (2005), TH-Books-Verlags-Gesellschaft, Frankfurt/Main, 1139 - 1161
6. Sommer, R., and Eitelberger, F.: Wertigkeit der Gliadin-Antikörper im Serum zur Diagnose der Zöliakie. *Wien Klin Wochenschr* 104/4 (1992), 86 - 92

14 SUMMARY FLOW CHART

- a. Dilute the samples 1/100 in sample buffer (100 mL, ready-to-use, orange) and mix.
- b. Dilute the wash buffer 10x-concentrate (100 mL, blue) with water and mix.
- c. Wash the wells once with 350 µL wash buffer each. Dispense 8 x 100 µL of the controls (3.0 mL, ready-to-use, green and red) and of the diluted samples into the wells of 1 column each. Incubate for 30 minutes at room temperature (23 °C ±3 °C).
- d. Wash the wells 4 times with 350 µL wash buffer each.
- e. Dispense 100 µL of the conjugate (14 mL, ready-to-use, red) into the wells. Incubate as in step c.
- f. Repeat washing step d.
- g. Dispense 100 µL of the substrate solution (14 mL, ready-to-use, black vial) per well. Incubate as in step c. Then, add 100 µL stop solution (14 mL, ready-to-use, colourless) per well and agitate the plate briefly.
- h. Immediately measure the absorbance at 450 nm.
- i. Evaluation (to be executed separately for each parameter): Determine the cut-off absorbance by multiplying the respective absorbance of the positive control with the corresponding factor quoted in the certificate of analysis. Then, calculate the ratio of the sample by dividing its respective absorbance by the corresponding cut-off absorbance (8 ratio values per sample).

ELISA zur qualitativen Bestimmung von Autoantikörpern (IgG) gegen dsDNA, RNP, Sm, SS-A/Ro, SS-B/La, Scl-70, CENP-B und Jo-1

1 ÜBERSICHT

1.1 Einführung und Hintergrund

Zirkulierende Autoantikörper gegen vielfältige zelluläre Antigene (antinukleäre Antikörper, ANA) sind charakteristisch für systemische, autoimmun-bedingte, rheumatische Erkrankungen des Bindegewebes (1, 2, 3, 4). Zu diesen zählen: Systemischer Lupus Erythematoses (SLE), Mischkollagenose (Mixed Connective Tissue Disease, MCTD), Sjögren-Syndrom (SS) A und B, progressive systemische Sklerodermie (PSS) bzw. CREST-Syndrom und Polymyositis (PM).

Die Diagnose dieser Krankheiten ist oft wegen überlappender Symptome schwierig; sie wird daher meist durch Messung der jeweils assoziierten Autoantikörper unterstützt. 8 der von diesen Antikörpern spezifisch erkannten Antigene sind auf der Festphase des vorliegenden Enzyme-linked Immuno Sorbent Assays (ELISA) zeilenweise immobilisiert:

Festphase Zeile	Antigen	Quelle	Krankheit	ungefähre Antikörperprävalenz (5)
A	dsDNA	Plasmid	SLE	60 - 90 %
B	RNP (Proteine A, C, 68kDa)	rekombinant	MCTD	95 %
			SLE	30 - 40 %
			PM	14 %
			SS	4 %
C	Sm (Proteine B, B', D)	Kalbsthymus	SLE	12 - 39 %
			MCTD	7 %
D	SS-A/Ro (60kDa-Protein)	Kalbsthymus	SS	60 - 100 %
			SLE	45 - 50 %
			MCTD	15 - 30 %
			PSS	5 - 7 %
			PM	5 - 7 %
E	SS-B/La	rekombinant	SS	30 - 90 %
			SLE	15 - 30 %
			MCTD	5 - 15 %
F	Scl-70 (DNA-Topoisomerase 1)	rekombinant	PSS	20 - 76 %
G	CENP-B (Centromer-Protein B)	rekombinant	CREST	40 - 80 %
H	Jo-1 (Histidyl-tRNA-Synthetase)	rekombinant	PM	20 - 40 %

Der Test dient dazu, in menschlichem Serum oder Plasma (vgl. Abschnitt 7) qualitativ die individuellen IgG-Autoantikörper zu bestimmen, die gegen eines der o.g. Antigene gerichtet sind; zur Eingangsd Diagnose bei Verdacht auf eine der assoziierten Erkrankungen. Der Test ist schnell (Inkubationszeit 30 / 30 / 30 Minuten) und flexibel (teilbare Festphase für 1 - 12 Analysen, gebrauchsfertige Reagenzien). Eine negative und eine positive Kontrolle prüfen die Funktion des Testansatzes; die Positivkontrolle dient gleichzeitig als Kalibrator für die Testauswertung.

1.2 Zweckbestimmung

ANA Profile 8 IgG ELISA ist ein Enzymimmunoassay (ELISA) zur qualitativen Einzelbestimmung von Antikörpern der Klasse IgG gegen Doppelstrang-DNA, U1-RNP-Komplexe (Proteine A, C, 68kDa), Sm, SS-A/Ro 60, SS-B/La, Scl-70 (DNA-Topoisomerase 1), CENP-B (Zentromerprotein B) und Jo-1 (Histidyl-tRNA-Synthetase) in humanen Serum- oder Plasmaprobe.

Seine Funktion ist die Hilfe bei der Differentialdiagnose von systemischen, entzündlichen, autoimmunvermittelten, rheumatischen Erkrankungen, wie systemischer Lupus erythematoses, Mischkollagenosen (MCTD, Sharp-Syndrom), Sjögren-Syndrom, Sklerodermie (progressive systemische Sklerose, CREST-Syndrom), Polymyositis und Dermatomyositis. Dieses Produkt ist nur für den manuellen oder automatisierten Einsatz durch professionelle Anwender in der In-vitro-Diagnostik bestimmt.

2 SICHERHEITSHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Der Test ist ausschließlich für die in vitro-Diagnostik bestimmt; nicht für die interne oder externe Anwendung an Menschen oder Tieren. Er darf nur von geschultem Fachpersonal eingesetzt werden.

Die Reagenzien dürfen nicht über ihr Verfallsdatum hinaus verwendet werden.

Das Kit wurde auf Transportstabilität getestet und kann bis zu 3 Tage ungekühlt versandt werden. Nach der Ankunft bei 2 - 8°C lagern. Im Zweifelsfall wenden Sie sich an Ihren lokalen Händler oder den Hersteller.

Es wird nachdrücklich empfohlen, das Protokoll genau einzuhalten.

Als antimikrobielles Reagenz enthalten der Probenpuffer und die Kontrollen Na-Azid; der Waschpuffer Bromonitrodioxan und das Konjugat Methylisothiazolon / Bromonitrodioxan. Das Substrat enthält 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂). Die Stopplösung, 0,2 M Schwefelsäure (H₂SO₄), ist sauer und ätzend.

Diese Reagenzien sind giftig, wenn sie aufgenommen werden. Daher müssen die üblichen Vorsichtsmaßnahmen bei der Handhabung gefährlicher Chemikalien getroffen werden. Jeden Körperkontakt vermeiden, Handschuhe und Schutzbrille tragen. Sollte dennoch Haut (oder Schleimhaut) von einem Reagenz benetzt werden, die betroffene Stelle sofort mit viel Wasser abspülen. Nicht mit dem Mund pipettieren. Die Reagenzien gemäß lokalen / nationalen Vorschriften entsorgen.

Na-Azid kann mit Kupfer- und Bleirohren reagieren und explosive Metallazide bilden. Beim Entsorgen mit Wasser nachspülen, um eine Akkumulation zu verhindern.

Die Kontrollen enthalten Komponenten menschlichen Ursprungs. Sie wurden daraufhin geprüft, ob Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Ag, Hepatitis B-Oberflächen (HBs)-Ag und Antikörper gegen HIV 1/2 und Hepatitis C-Virus (HCV) vorliegen und zeigten negative Resultate; entweder in einem FDA-zugelassenen oder einem CE-konformen Test, entsprechend der Europäischen Richtlinie 98/79/EC.

Allerdings kann kein Test garantieren, dass Material humanen Ursprungs tatsächlich nicht infektiös ist. Die Präparate sollten daher als potenziell infektiös behandelt und entsprechend entsorgt werden, ebenso wie die Proben (und Reste von ihnen); gemäß CDC (Center of Disease Control, Atlanta, USA)- oder anderen lokalen / nationalen Richtlinien zu Laborsicherheit und Dekontaminierung.

3 TESTPRINZIP

Die Kavitäten der Festphase sind zeilenweise beschichtet mit den o.g. Autoantigenen. An dieser Oberfläche laufen die folgenden immunologischen Reaktionen ab:

1. Reaktion: Antigen-spezifische Antikörper aus der Probe binden an ihr jeweiliges immobilisiertes Antigen; es bildet sich der Antigen-Antikörper-Komplex. Nicht-gebundene Probenbestandteile werden anschließend von der Festphase gewaschen.
2. Reaktion: Ein zweiter, gegen human-IgG gerichteter und mit Peroxidase (HRP) konjugierter Antikörper wird zugesetzt. Dieses Konjugat bindet seinerseits an den Antigen-Antikörper-Komplex. Überschüssiges Konjugat wird anschließend von der Festphase gewaschen.
3. Reaktion: Der Enzym-markierte Komplex setzt ein farbloses Substrat in ein farbiges Produkt um. Das Ausmaß der Farbentwicklung in jeder Zeile der Festphase spiegelt die Konzentration des jeweiligen Antigen-spezifischen Autoantikörpers (IgG) in der Probe wider (8 Werte pro Probe).

4 INHALT DES TESTKITS

a. ANA Profile-8 Coated Microwell Plate

1 Mikrowell-Platte, zeilenweise mit den 8 o.g. individuellen Autoantigenen beschichtet. Hermetisch in einem Beutel aus laminiertes Metallfolie verpackt, zusammen mit Trockenmittel. Die Platte besteht aus 12 einzelnen Streifen, so dass der Test flexibel und ökonomisch verwendet werden kann.

MWP	12x8
-----	------

b. Sample buffer

Probenpuffer, 100 mL, gebrauchsfertig, orange gefärbt.
Enthält Tris-gepufferte Saline (TBS), bovines Serumalbumin (BSA), Tween und Na-Azid.

BUF	SPL
-----	-----

c. Wash buffer

Waschpuffer, 100 mL, 10x-Konzentrat, blau gefärbt.
Enthält TBS, Tween und Bromonitrodioxan.

BUF	WASH	10x
-----	------	-----

d. ANA Profile-8 IgG Negative und Positive Control

Negative und positive Kontrolle, je 3,0 mL, gebrauchsfertig, grün bzw. rot gefärbt.
Enthalten TBS, BSA, Tween und Na-Azid.

CONTROL	-
---------	---

CONTROL	+
---------	---

e. ANA Profile-8 IgG 14 mL Conjugate

Anti-human IgG HRP Konjugat, 14 mL, gebrauchsfertig, rot gefärbt.

Gepufferte Lösung mit stabilisierendem Protein, Methylisothiazolon und Bromonitrodioxan.

CONJ	IgG
------	-----

f. Substrate

Substrat, 14 mL, gebrauchsfertig, farblos.

Enthält eine gepufferte Lösung von TMB und H₂O₂, abgefüllt in einem Licht-undurchlässigen Gefäß.

SUBS	TMB
------	-----

g. Stop solution

Stopplösung (0,2 M H₂SO₄), 14 mL, farblos, gebrauchsfertig.

Vorsicht: Schwefelsäure ist ätzend.

SOLN	STOP
------	------

h. Gebrauchsanweisung**i. Chargen-spezifisches Analysen-Zertifikat**

5 BENÖTIGTE, ABER NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN

- a. Deionisiertes oder destilliertes Wasser
- b. Messzylinder, 1000 mL
- c. Reagenzröhrchen für die Probenverdünnung (Transfer-Röhrchen im Mikrowell-Plattenformat empfohlen)
- d. Pipetten für 10, 100 und 1000 µL (1- und 8-Kanalpipetten empfohlen)
- e. Mikrowell-Plattenwaschautomat (optional)
- f. Mikrowell-Plattenphotometer mit 450 nm-Filter
- g. ELISA Auswertungsprogramm (empfohlen)

6 AUFBEWAHRUNG DES TESTKITS

Das Testkit muss bei 2 °C - 8 °C gelagert werden. Es darf nicht eingefroren werden. Es ist bis zum Verfallsdatum einsetzbar, das auf dem Etikett der Verpackung angegeben ist; danach nicht mehr verwenden.

7 REAGENZIEN- UND PROBENVORBEREITUNG / ANFORDERUNGEN AN DIE PROBEN

Wegen möglicherweise unterschiedlichen Lagerungs- und Transport-Bedingungen dürfen korrespondierende Komponenten aus verschiedenen Kits nicht vermischt oder gegeneinander ausgetauscht werden.

Wird das Kit in mehreren Portionen verwendet, sollten nur die für den aktuellen Test benötigten Volumina den verschiedenen Fläschchen entnommen werden. Dabei ist **ganz wichtig**, dass es zu keinerlei Kreuzkontamination zwischen den Reagenzien kommt. Nur saubere Pipetten verwenden; Reagenzienreste **nicht** in die Original-Fläschchen zurückgeben.

- a. Den Beutel mit der Festphase akklimatisieren lassen, erst dann öffnen. Die für den aktuellen Test evtl. nicht benötigten Kavitäten sofort aus dem Gitterrahmen nehmen und zusammen mit dem Trockenmittel in den Folienbeutel zurücklegen. Diesen hermetisch verschließen und bis zur künftigen Verwendung weiter gekühlt lagern.
- b. Das Waschpuffer-10x-Konzentrat (100 mL, blau) wird mit 900 mL deionisiertem Wasser verdünnt und gut durchmischt. Gekühlt bei 2 °C - 8 °C ist diese Lösung für mehrere Wochen stabil.
- c. Präparation der Proben:
Patientenseren als potenziell infektiös betrachten und entsprechend vorsichtig handhaben.
Neben Serum ist auch EDTA- oder Zitrat-behandeltes Plasma als Probenmaterial geeignet; Heparin-behandeltes Plasma jedoch nicht.

Anforderungen an die Proben:

Stark lipämische oder hämolysierte Proben sowie mikrobiell verunreinigte Seren können falsche Ergebnisse liefern und sollten daher vermieden werden.

Die Proben mit üblicher Labortechnik präparieren. Trübe Proben müssen zunächst geklärt (zentrifugiert) werden. Die klaren oder geklärten Proben werden mit dem Probenpuffer **1:100** in Reagenzröhrchen verdünnt; bspw. 10 µL Serum + 990 µL Probenpuffer. Die Verdünnungen gut durchmischen.

Zum schnellen Dispensieren während des Testablaufs empfiehlt es sich, Kontrollen und Proben in Transferröhrchen (Microwell-Format) vorzulegen. Dann kann mit einer 8-Kanal-Pipette gearbeitet werden.

Proben, die nicht sofort analysiert werden können, müssen bei 2 °C - 8 °C gelagert und innerhalb von 3 Tagen gemessen werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden. Aufgetaute Proben vor dem Verdünnen durchmischen.

8 DURCHFÜHRUNG DES TESTS

8.1 Manuelle Durchführung

Bevor der Test gestartet wird, müssen alle Kitkomponenten Raumtemperatur (23 °C ±3 °C) angenommen haben.

Um das bestmögliche Ergebnis (d.h. ein maximales Verhältnis zwischen spezifischem und Hintergrund-Signal) zu erreichen, ist **sorgfältiges Waschen** ganz wesentlich (Schritte a, c und e). Insbesondere ist es wichtig, die **Waschlösung vollständig aus den Kavitäten zu entfernen**. Dazu klopft man die Festphase auf Saugpapier aus. Automatische Wascher müssen daraufhin geprüft werden, ob ihre Ergebnisse mit denen vergleichbar sind, die mit manuellem Waschen erzielt werden.

- Unmittelbar vor Testbeginn die Kavitäten einmal mit je 350 µL Waschpuffer füllen, ca. 10 Sekunden einwirken lassen und wieder entleeren.
- Die Kontrollen (je 3,0 mL, gebrauchsfertig, grün und rot) und die verdünnten Proben (1 - 10) zügig in die Kavitäten dispensieren, wie unten angegeben; 100 µL pro Kavität.

dsDNA	⊖	⊕	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
RNP	⊖	⊕	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sm	⊖	⊕	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SS-A/Ro	⊖	⊕	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SS-B/La	⊖	⊕	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Scl-70	⊖	⊕	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CENP-B	⊖	⊕	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Jo-1	⊖	⊕	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Die Platte 30 Minuten bei Raumtemperatur (23 °C ±3 °C) inkubieren.

- Die Kavitäten 4x wie in Schritt a waschen.
- Je 100 µL Konjugat (14 mL, gebrauchsfertig, rot) zügig (am besten mit einer 8-Kanal-Pipette) in die Kavitäten pipettieren. Inkubieren wie in Schritt b.
- Waschschritt c wiederholen.
- Je 100 µL Substrat (14 mL, gebrauchsfertig, farblos, im schwarzen Gefäß) zügig (am besten mit einer 8-Kanal-Pipette) in die Kavitäten pipettieren. Inkubieren wie in Schritt b. Das Substrat ist lichtempfindlich; direkte Belichtung (bspw. Sonnenlicht) während der Inkubation vermeiden.
- Je 100 µL Stopplösung (14 mL, gebrauchsfertig, farblos. Vorsicht ätzend!) zügig (am besten mit einer 8-Kanal-Pipette) in die Kavitäten pipettieren; in derselben Reihenfolge wie beim Substrat: Farbumschlag von blau nach gelb. Die Festphase für ca. 10 Sekunden vorsichtig agitieren, am besten auf einem Schüttler.
- Die Platte sofort im Mikrowell-Plattenphotometer bei 450 nm messen.

Überschüssige Reagenzien weiter bei 2 °C - 8 °C lagern, wenn sie später noch einmal verwendet werden sollen.

8.2 Dynex DS2 automatisches ELISA System

Der Test wurde validiert für die Verwendung mit dem Dynex DS2-Automaten. Eine Beschreibung des Programmablaufs für die Assay-Durchführung und -Auswertung kann als pdf-Datei zur Verfügung gestellt werden. Die Parameter dieses Programms sind nur als Vorschlag zu verstehen und müssen evtl. vom Anwender an die Erfordernisse des aktuellen Tests angepasst werden. Generell haben wir versucht, so eng wie möglich am manuellen Protokoll (s.o.) zu bleiben. Allerdings musste die Substrat-Inkubationsdauer verkürzt werden wegen der zwangsläufig erhöhten Temperatur innerhalb des Geräts. Abschnitt 11.8. vergleicht Ergebnisse der manuellen Durchführung und des DS2 ELISA Systems.

9 AUSWERTUNG UND QUALITÄTSKONTROLLE

Der Test wird qualitativ ausgewertet: Die Absorption der Proben wird verglichen mit der grenzwertigen Absorption (= cut-off), getrennt für jeden der 8 Parameter. Die jeweilige cut-off-Absorption (8 individuelle Werte) wird bestimmt anhand der positiven Kontrolle, die gleichzeitig als Kalibrator fungiert, gemäß der Formel:

$$\text{Absorption}_{\text{cut-off}} = \text{Absorption}_{\text{Positivkontrolle}} \times \text{Faktor}$$

Der Faktor hängt von der Kit-Charge ab und ist für jeden Parameter im Chargen-spezifischen Analysen-Zertifikat angegeben; dies liegt jedem Kit bei. Beispiel:

$$\begin{aligned} \text{Absorption}_{\text{positive Kontrolle}} &= 1250 \text{ mOD} \\ \text{Faktor} &= 0,35 \\ \text{Absorption}_{\text{cut-off}} &= 1250 \text{ mOD} \times 0,35 = 438 \text{ mOD} \end{aligned}$$

Um einen Eindruck zu gewinnen, wie hoch positiv eine bestimmte Probe mit den verschiedenen Antigenen reagiert, berechnet man den jeweiligen Ratio-Wert zwischen Proben- und cut-off-Absorption; und zwar 8 x pro Probe, nach der Formel:

$$\text{Ratio} = \text{Absorption}_{\text{Probe}} / \text{Absorption}_{\text{cut-off}}$$

Beispiel:

$$\begin{aligned} \text{Absorption}_{\text{cut-off}} &= 438 \text{ mOD} \\ \text{Absorption}_{\text{Probe}} &= 1480 \text{ mOD} \\ \text{Ratio} &= 1480 \text{ mOD} / 438 \text{ mOD} = 3,4 \end{aligned}$$

Qualitätskontrolle: Die positive und die negative Kontrolle dienen der Überprüfung des Tests. Ihre jeweils akzeptablen Bereiche sind im Chargen-spezifischen Analysen-Zertifikat angegeben. Die Messwerte der Kontrollen müssen innerhalb der Toleranzgrenzen liegen; ansonsten sind die Ergebnisse des Tests ungültig.

10 INTERPRETATION DER ERGEBNISSE / GRENZEN DER METHODE

Um die cut off-Konzentration (d.h. Ratio = 1,0) jedes ANA im vorliegenden Test zu bestimmen, wurden ein Normalseren-Kollektiv und die jeweiligen Positiv-Kollektive gemessen. Diese Daten wurden anschließend Parameter für Parameter einer ROC-Analyse gemäß (6) unterzogen; vgl. Abschnitt 11.7.

Die so ermittelten cut-off-Werte führen zu den im Folgenden beschriebenen Testcharakteristika. Auf der Basis dieser Messungen schlagen wir für die Beurteilung von Patientenseren vor:

	Ratio
normaler (negativer) Bereich	< 0,80
cut-off	1,00
grenzwertiger Bereich	0,80 - 1,25
positiver Bereich	> 1,25

Diese Spezifikationen gelten einheitlich für alle 8 Parameter. Sie sind allerdings nur als Anhaltspunkt zu verstehen. Zu ihrer Überprüfung sollten bei jedem Test Normalseren mitgeführt werden.

Ein *negatives* Ergebnis zeigt an, dass der Patient vermutlich keinen erhöhten Titer an IgG-Antikörpern gegen das betreffende Antigen aufweist. Folglich ist die korrespondierende systemische Autoimmunkrankheit (wie eingangs beschrieben) eher unwahrscheinlich, kann jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Ein *positives* Ergebnis sollte als Hinweis auf die assoziierte Erkrankung interpretiert werden. Es empfiehlt sich, anschließend den ursächlichen Autoantikörper quantitativ in einem monospezifischen ELISA zu bestimmen.

Proben mit *grenzwertigen* Resultaten sollten als zweifelhaft betrachtet und als solche berichtet werden. Es empfiehlt sich, nach etwa 2 Wochen eine weitere Probe zu messen, parallel mit der zuerst entnommenen, um eine mögliche Änderung des Antikörper-Titers zu erfassen.

Wie bei jedem serologischen Test sollten dessen Resultate nicht isoliert interpretiert werden, sondern im Zusammenhang mit den Symptomen des Patienten und anderen diagnostischen Kriterien.

11 TESTCHARAKTERISTIKA

11.1 Standardisierung

Der Test wird mit einem gereinigten Serumpräparat standardisiert, das IgG-Antikörper gegen jedes der immobilisierten Antigene enthält. Es bildet das Ausgangsmaterial beider Testkontrollen. Das Verhältnis der Antikörper wurde so eingestellt, dass die Kontrollen auf allen 8 Festphasen (Zeilen der Mikrowell-Platte) ungefähr dasselbe Signal erzeugen. Das Präparat wurde seinerseits kalibriert an einem Satz monospezifisch-positiver Seren, der ausschließlich für diesen Zweck reserviert ist. Der Grad der Reaktivität einer Probe wird als Ratio angegeben, wie oben ausgeführt; individuell für jeden der 8 Parameter.

11.2 Analytische Spezifität

Der Test weist spezifisch und differenziell humane IgG-Antikörper nach, die gegen eines der angegebenen Antigene gerichtet sind. Er wurde u.a. anhand der allgemein zugänglichen, humanen Referenzseren des "Center of Disease Control" (CDC, Atlanta, USA) validiert. Folgende Resultate (Ratio-Werte) sind typisch:

Serum	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CDC- result	ds- DNA	SS-B/La	--	U1- RNP	Sm	--	SS-A/Ro	--	Scl-70	Jo-1
Immun-Fluorescence	homogen	speckled	speckled	--	--	nucleolar	--	Centromere	--	--
dsDNA	3,5	0,2	0,2	0,2	0,4	0,1	0,4	0,2	0,4	0,1
RNP	0,8	0,2	5,0	3,9	5,3	1,0	0,3	0,2	0,3	0,2
Sm	1,8	0,2	1,6	0,2	5,4	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2
SS-A/Ro	0,4	2,9	4,2	0,4	1,0	0,2	5,7	0,2	0,7	0,2
SS-B/La	0,2	5,0	4,2	0,2	0,3	0,6	0,2	0,2	0,3	0,2
Scl-70	0,3	0,2	0,3	0,3	0,6	1,0	0,2	0,2	5,6	0,2
CENP-B	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	4,4	0,3	0,2
Jo-1	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,2	0,3	0,2	0,3	7,7

11.3 Nachweisgrenze (analytische Sensitivität)

Die Nachweisgrenze ist definiert als diejenige Konzentration des Analyten, die der gemittelten Absorption des Probenpuffers entspricht, zu der die 3-fache Standardabweichung (s) addiert wurde. Sie wurde zu $< 0,2$ (Ratio; $n = 12$) für jeden der 8 Parameter bestimmt.

Empfohlener Messbereich: $0,3 < \text{Ratio} < 7$

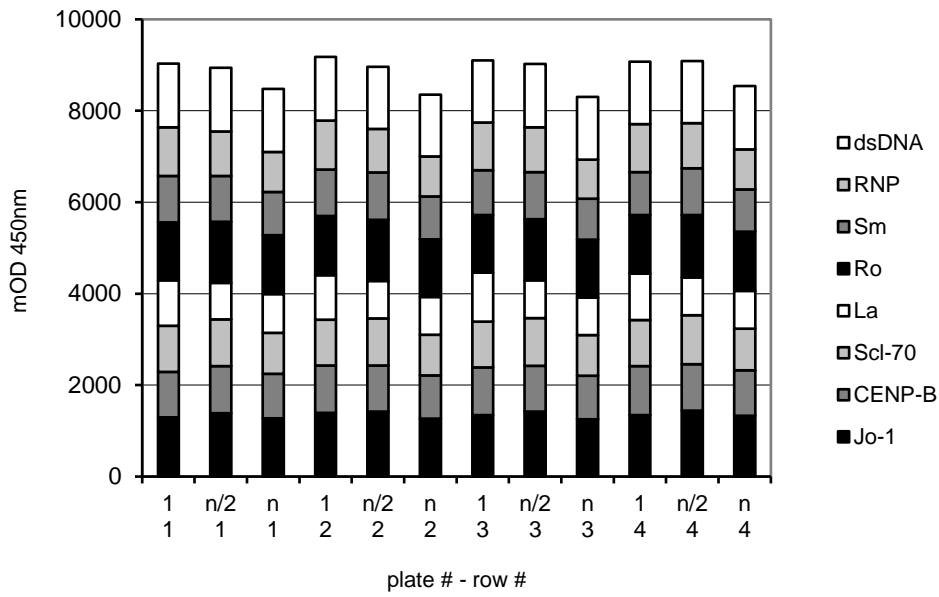
Die Interferenz mit Antikoagulanzen (EDTA, Citrat, Heparin) in den Proben wurde getestet und es wurden keine Interferenzeffekte festgestellt

11.4 Festphasen-Homogenität

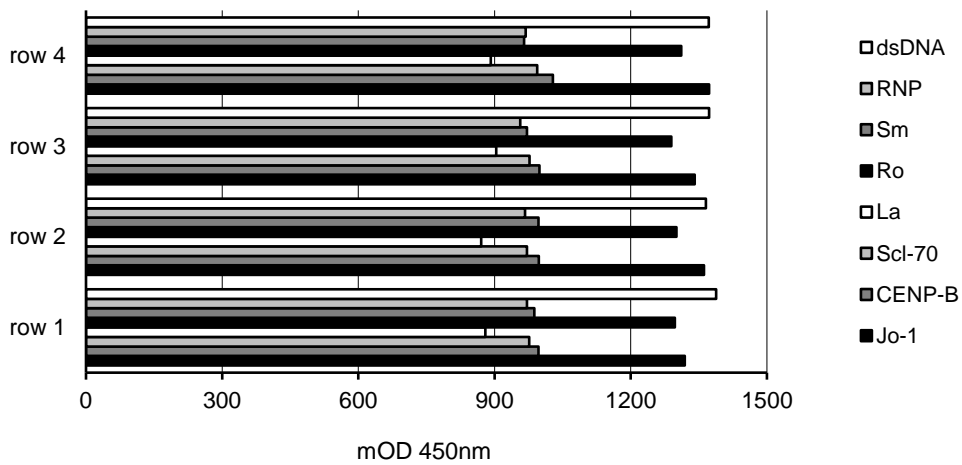
Dieser Parameter ist regulärer Bestandteil der QC jeder Produktions-Charge. Die Homogenität wird bestimmt durch Messung einer gleichförmig-positiven, aber nicht-sättigenden Probe (IgG); und zwar 3 (ausgewählte Platten) x 8 (Zeilen) x 12 (Spalten) = 288-fach.

Akzeptanz-Kriterium: mOD-Variationskoeffizient (VK), Zeilen-weise über die Platten $< 10\%$. Die folgende Abbildung zeigt einen repräsentativen Auszug einer solchen Analyse (Ch.-Bez. der Festphase: 21020).

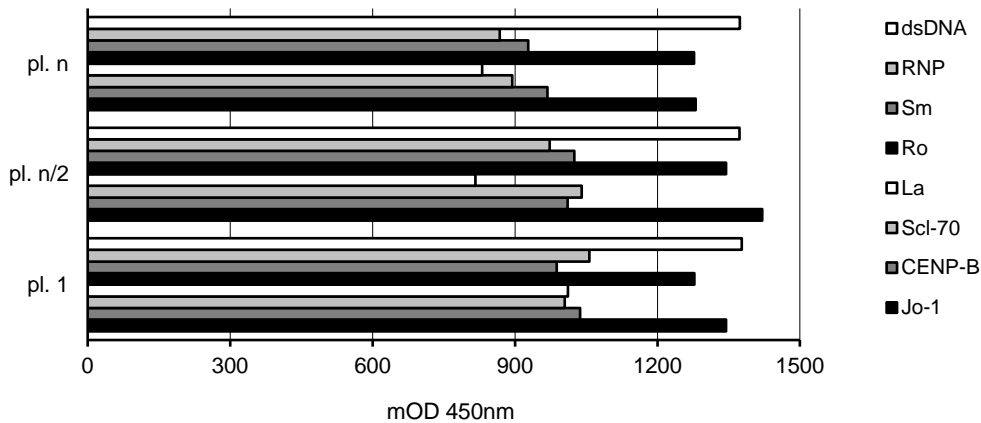
plate	1	n/2	n	1	n/2	n	1	n/2	n	1	n/2	n	mean	cv %
row	1	1	1	2	2	2	3	3	3	4	4	4		
line a	1396	1387	1382	1392	1357	1348	1359	1384	1374	1363	1364	1389	1375	1,2
line b	1063	973	878	1074	955	873	1041	980	848	1050	983	872	966	8,5
line c	1011	1006	946	1014	1036	940	982	1032	900	944	1025	926	980	4,8
line d	1272	1338	1282	1297	1340	1265	1263	1338	1268	1278	1362	1293	1300	2,7
line e	992	796	852	971	817	824	1068	826	817	1016	829	831	887	10,8
line f	1011	1024	895	1002	1027	886	1000	1044	887	1005	1067	909	980	6,7
line g	990	1024	976	1038	1007	948	1043	997	957	1077	1016	993	1006	3,7
line h	1297	1390	1271	1392	1425	1267	1348	1423	1252	1342	1445	1331	1349	5,0



Values of lines a - h in rows 1 - 4, averaged over plates 1, n/2 and n



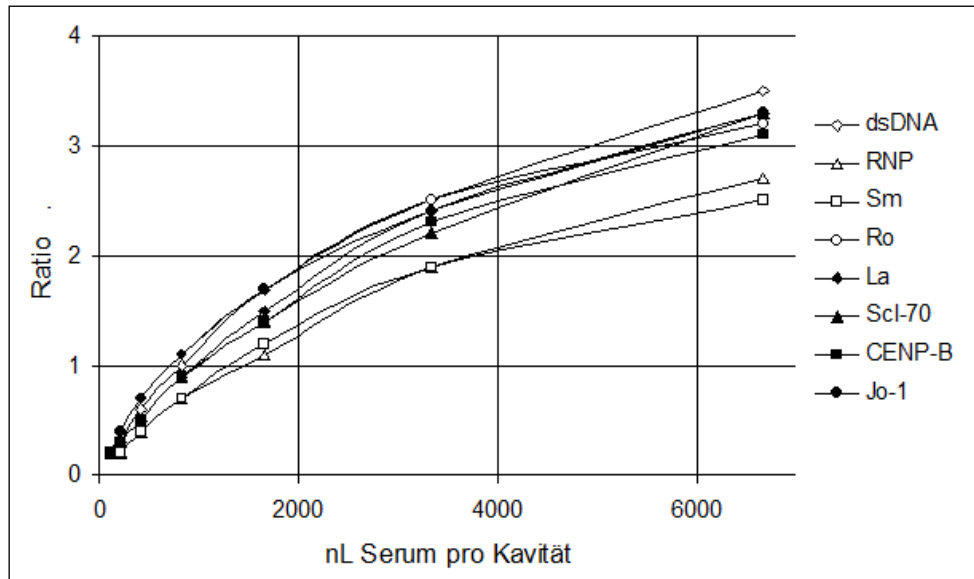
Values of lines a - h in plates 1, n/2 and n,
averaged over rows 1 - 4



11.5 DOSIS-WIRKUNGS-BEZIEHUNG

Um diese Eigenschaft des ELISAs zu bestimmen, wurden individuelle Seren zu Pools mit gleichförmiger Reaktivität gegenüber allen 8 Antigenen vereinigt und in serieller 2-facher Verdünnung gemessen. Die Abbildung unten zeigt ein typisches Ergebnis.

Eine annähernd lineare Beziehung zwischen Probenkonzentration und resultierender Ratio beschränkt sich auf Ratio-Werte < 2. Dies wird durch die qualitative Auswertung verursacht (vgl. Abschnitt 9); im Unterschied zu quantitativen ELISAs, die mit einer Standardkurve ausgewertet werden.



11.6 Präzision

Um die Präzision des Tests zu ermitteln, wurde die Variabilität der Ergebnisse unter folgenden Bedingungen ermittelt: a. innerhalb eines Assays und zwischen 3 Assays, b. zwischen 3 Anwendern und c. zwischen 2 Kit-Chargen. Die Werte für Ratio und Variabilitäts-Koeffizienten (VK) sind über alle 8 Antigene gemittelt.

a) Intra- und Inter-Assay Variabilität (n pro Parameter = 3 bzw. 9)

Probe	Ratio	Variabilität (VK, %)	
		Intra-Assay	Inter-Assay
1	1.2	3.7	4.5
2	1.9	1.5	2.4
3	2.9	1.5	2.0

b) Operator-zu-Operator Variabilität (n pro Parameter = 2)

Probe	Ratio	Variabilität (VK, %)
1	1.1	2.4
2	1.8	1.8
3	2.7	1.8

c) Variabilität zwischen 2 Kit-Chargen (n pro Parameter = 2)

Probe	Ratio	Variabilität (VK, %)
1	1.1	5.3
2	1.8	3.3
3	2.8	6.0

11.7 Häufigkeits-Verteilung der verschiedenen ANA (IgG)

a) In einem Normalkollektiv

Dies wurde analysiert mit einem Serenkollektiv von Blutspendern, gleichmäßig nach Geschlecht und Alter verteilt. Folgende Verteilung der Analyte wurde beobachtet (angegeben in Ratio-Werten; s = Standardabweichung):

Parameter	Anzahl Seren	Mittel (MW)	MW + s	MW + 2 s	Median	95. Perzentile	Diagnost. Spezifität
dsDNA	80	0,28	0,51	0,75	0,21	0,63	98 %
RNP	80	0,32	0,45	0,57	0,29	0,55	100 %
Sm	80	0,18	0,21	0,23	0,18	0,22	100 %
SS-A/Ro	80	0,25	0,30	0,35	0,25	0,33	100 %
SS-B/La	160	0,16	0,27	0,39	0,13	0,31	100 %
Scl-70	80	0,40	0,61	0,83	0,33	0,72	98 %
CENP-B	80	0,25	0,33	0,41	0,23	0,38	100 %
Jo-1	80	0,28	0,40	0,51	0,25	0,43	99 %

b) In positiven Kollektiven

In 8 Kollektiven positiver Seren wurde die folgende Verteilung der jeweiligen Autoantikörper ermittelt (angegeben in Ratio-Werten). Die untersuchten Seren waren zuvor mit unabhängigen Methoden (bspw. in monospezifischen, CE-konformen ELISAs, durch Immunfluoreszenz) und/oder in verschiedenen Ringversuchen positiv gefunden worden oder waren klinisch definiert.

Parameter	Anzahl Seren	Mittel (MW)	MW + s	MW + 2 s	Median	5. Perzentile	Diagnost. Sensitivität
dsDNA	11	2.45	1.20	< 0	2.20	1.00	91 %
RNP	14	5.54	3.97	2.20	6.40	2.86	100 %
Sm	12	3.95	2.89	1.83	4.40	1.97	100 %
SS-A/Ro	17	4.92	4.02	3.12	5.30	3.60	100 %
SS-B/La	31	39.76	< 0	< 0	10.44	1.45	100 %
Scl-70	10	4.46	3.25	2.04	4.70	2.55	100 %
CENP-B	11	4.61	3.61	2.61	4.80	3.05	100 %
Jo-1	6	6.05	5.72	5.38	6.10	5.58	100 %

Die angegebenen Werte für die diagnostische Spezifität und Sensitivität des ELISAs gelten nur für die gemessenen Seren; andere Kollektive können abweichende Ergebnisse erzielen.

11.8 Manuelle Durchführung vs. Dynex DS2 automatisches ELISA System

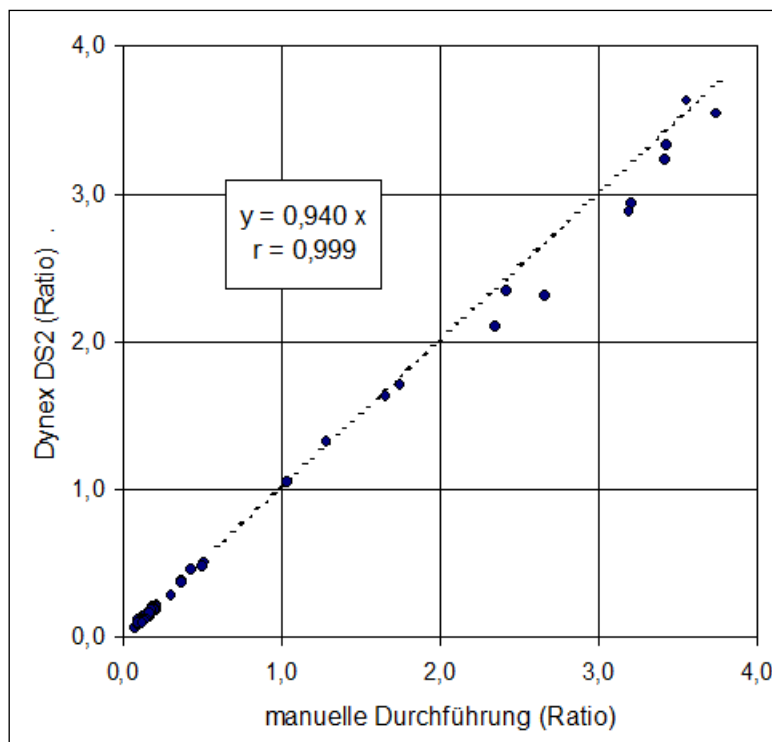
Variabilität:

Mit Testkits aus einer einzigen Produktions-Charge wurde die Variabilität der Assayergebnisse verglichen zwischen manueller Durchführung und dem automatischen DS2 ELISA System (die VK-Werte sind über alle 8 Antigene gemittelt):

	manuelle Durchführung	Dynex DS2
intra-Assay Variabilität (n pro Parameter = 6)	mittl. VK = 1,4 %	mittl. VK = 1,3 %
inter-Assay Variabilität (n pro Parameter = 18)	mittl. VK = 1,6 %	mittl. VK = 2,0 %

Korrelation:

Um diese Eigenschaft des ANA Profile 8 ELISAs zu ermitteln, wurden 10 CDC-Seren (vgl. Abschnitt 11.2) passend verdünnt und auf allen 8 Antigenen mit beiden Methoden gemessen; Resultat:



12 GARANTIE UND HAFTUNG

DRG garantiert, dass das ausgelieferte Produkt gründlich getestet wurde, um sicherzustellen, dass es seine Spezifikationen erfüllt und der hier gegebenen Beschreibung entspricht. Weitergehende Garantien werden nicht gegeben.

Die hier genannten Testcharakteristika wurden mit der angegebenen Methode ermittelt. Jede Änderung der Methode kann die Ergebnisse beeinflussen. In einem solchen Fall verweigert DRG jede Haftung, ob ausgesprochen, impliziert oder gesetzlich. Darüber hinaus kann DRG keinerlei Haftung für Schäden übernehmen, die aufgrund einer unkorrekten Lagerung oder Anwendung des Produktes entstanden sind; direkt, indirekt oder als Konsequenz.

13 LITERATUR

1. Nakamura, R. M., Tan, E. M.: Update on autoantibodies to intracellular antigens in systemic rheumatic diseases. Clin Lab Med 12 (1992), 1 - 23
2. Guma, M., Keil, L. B.: Autoantibodies to cellular antigens in systemic autoimmune diseases. J Clin Immunoassay 17 (1994), 98 - 107
3. Fritzler, M. J.: Clinical relevance of autoantibodies in systemic rheumatic diseases. Mol Biol Rep 23 (1996), 133 - 145
4. Hietarinta, M., Lassila, O.: Clinical significance of antinuclear antibodies in systemic rheumatic disease. Ann Med 28 (1996), 283 - 291
5. Messinger, M.: Autoantikörper bei systemischen entzündlich-rheumatischen Erkrankungen (Kollagenosen). In: L. Thomas (ed.): Labor und Diagnose (2005), TH-Books-Verlags-Gesellschaft, Frankfurt/Main, 1139 - 1161
6. Sommer, R., und Eitelberger, F.: Wertigkeit der Gliadin-Antikörper im Serum zur Diagnose der Zöliakie. Wien Klin Wochenschr 104/4 (1992), 86 – 92

14 KURZANLEITUNG

- a. Die Proben 1/100 in Probenpuffer (100 mL, gebrauchsfertig, orange) verdünnen und durchmischen.
- b. Das 10x-Konzentrat des Waschpuffers (100 mL, blau) mit Wasser verdünnen und durchmischen.
- c. Die Kavitäten der Festphase einmal mit je 350 µL Waschpuffer waschen. 8 x 100 µL der Kontrollen (3,0 mL, gebrauchsfertig, grün und rot) und der verdünnten Proben jeweils in die Kavitäten einer Spalte dispensieren. 30 Minuten bei Raumtemperatur ($23 \pm 3^\circ\text{C}$) inkubieren.
- d. Die Kavitäten 4x mit je 350 µL Waschpuffer waschen.
- e. Je 100 µL des Konjugats (14 mL, gebrauchsfertig, rot) in die Kavitäten pipettieren. Inkubieren wie in Schritt c.
- f. Waschschrift d wiederholen.
- g. Je 100 µL des Substrats (14 mL, gebrauchsfertig, in einem schwarzen Fläschchen) in die Kavitäten pipettieren. Inkubieren wie in Schritt c. Dann je 100 µL Stopplösung (14 mL, gebrauchsfertig, farblos) zusetzen und die Platte kurz schütteln.
- h. Sofort die Absorption bei 450 nm messen.
- i. Auswertung (für jeden Parameter separat durchzuführen): Die cut-off-Absorption ermitteln, indem die jeweilige Absorption der positiven Kontrolle mit dem zugehörigen Faktor multipliziert wird, der im Analysen-Zertifikat angegeben ist. Dann den Ratio-Werte der Probe berechnen, indem ihre jeweilige Absorption durch die korrespondierende cut-off-Absorption dividiert wird (8 Ratio-Werte pro Probe).

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico In vitro	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Catalogue number *	Artikelnummer *	Numero di Catalogo	Número de catálogo	Référence de catalogue
	Batch code *	Chargencode *	Codice del lotto	Codigo de lote	Numéro de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Utilizzare prima del	Establa hasta	Utiliser jusque
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Caution *	Achtung *			
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Contenu
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité